4 月 April
2019, 62(4): 475 – 488
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.04.010

基于线粒体基因组控制区序列的中国冰清绢蝶遗传分化和谱系生物地理研究

王运良[1], 潘忠琪[1], 陈可可[1], 陶瑞松[1], 苏成勇[1], 郝家胜[1,*], 杨 群[2,*]

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 中国科学院南京地质与古生物学研究所, 南京 210008)

摘要:【目的】分析中国冰清绢蝶 *Parnassius glacialis* 遗传多样性和遗传分化情况及其系统发生关系,推测其起源及分歧时间,并探讨其历史生物地理分布格局的成因。【方法】以 2008 – 2016 年采集于中国 13 个地区的冰清绢蝶的 325 头及绢蝶属其他 11 个种的 11 头个体样品,对其线粒体基因组的 AT 富集区(控制区)序列进行 PCR 扩增和序列测定,采用 MEGA 6.0, Dna SP 5.1 和 Arlequin 3.5 等软件分析其遗传多样性和遗传分化情况;以其他近缘绢蝶种类作为外类群,采用 PhyML3.0, MrBayes 3.2 和 BEAST V1.8.3 等软件重建冰清绢蝶的系统发生树,并利用宽松分子钟和校准方法推测中国冰清绢蝶的起源和分歧时间;同时结合现今冰清绢蝶的地理分布特点和第四纪以来的地球环境事件,分析其扩散路径,探讨其历史生物地理分布格局及成因。【结果】冰清绢蝶 AT 富集区序列长度介于 487 ~ 495 bp 之间,平均为 491 bp,其长度的差异主要体现在 Poly(T) 或 Poly(A) 的数目差异,A + T 平均含量为 95.76%。供试冰清绢蝶 13 个地理居群 325 头个体中,共检测出基于线粒体基因组 AT 富集区序列的 239 个单倍型,单倍型多样性 *Hd* 为 0.9971;核苷酸多态性指数 π 值为 0.02948, Theta (per site) *Eta* 值为 0.06594。系统发生分析和分子定年显示,冰清绢蝶和白绢蝶 *P. stubbendorfii* 为近缘姊妹种,二者在距今 7.52 百万年(Ma)的中新世晚期开始分化。冰清绢蝶的祖先可能起源于我国西南地区(现今横断山脉-喜马拉雅附近的青藏高原东北缘)距今 1.53 Ma 的更新世时期,先由起源地先期扩散到达小陇山、秦岭一带;后来,由于第四纪的冰期-间冰期轮回事件和扩散路径的不同而分化出 2 大支系,但两个支系之间存在少量的单倍型相互混杂现象;随后,2 大支系继续向低海拔、低纬度地区扩散,即通过伏牛山脉向东北方向扩散到嵩山、泰山、昆嵛山一带,经大别山系向东南方向扩散到琅琊山、紫金山和天目山一带。【结论】中国 13 个居群的冰清绢蝶没有形成明显的地理分化格局,其遗传变异主要来自居群内部,居群间的遗传分化现象尚不明显;冰清绢蝶起源于更新世时期的较高海拔地区,由于第四纪的冰期-间冰期轮回事件以及扩散路径的不同而形成 2 大支系并向中国东部和南部低海拔和低纬度地区扩散。

关键词: 绢蝶属; 冰清绢蝶; 线粒体基因组; AT 富集区; 谱系发育; 遗传分化; 谱系生物地理

中图分类号: Q963　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2019)04-0475-14

Genetic differentiation and phylogeography of the alpine butterfly *Parnassius glacialis* (Papilionidae: Parnassinae) in China: evidence from mitogenomic AT-rich region

WANG Yun-Liang[1], PAN Zhong-Qi[1], CHEN Ke-Ke[1], TAO Rui-Song[1], SU Cheng-Yong[1], HAO Jia-Sheng[1,*], YANG Qun[2,*] (1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China; 2. Nanjing Institute of Geology and Paeleontology, Chinese Academy of Sciences,

基金项目: 国家自然科学基金项目(41172004, 41472028); 中国科学院战略性先导专项(XDB26000000)
作者简介: 王运良, 男, 1975 年 12 月生, 安徽太和人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫分子系统学与进化, E-mail: wyl1119@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: jshaonigpas@sina.com; qunyang@nigpas.ac.cn
收稿日期 Received: 2018-08-03; 接受日期 Accepted: 2018-11-07

Nanjing 210008, China)

Abstract:【Aim】This study aims to analyze the genetic diversity, genetic differentiation, and phylogenetic relationships of populations of the alpine butterfly *Parnassius glacialis* in China, to infer their origin and divergence time, and to explore their spatiotemporally evolutionary history.【Methods】The mtDNA AT-rich sequences of 325 individuals from 13 geographic populations of *P. glacialis* in China and 11 individuals of other 11 *Parnassius* species were amplified and sequenced, and their sequence variation and genetic differentiation were analyzed using MEGA 6.0, Dna SP 5.1, Arlequin 3.5 and other genetics analysis software. Using the closest relatives as the outgroups, the *P. glacialis* phylogenetic trees were reconstructed with such analytical software as PhyML3.0, MrBayes 3.2, and BEAST V1.8.3, and the origin and divergence time of the *P. glacialis* lineages were estimated by using relaxed molecular dating method and calibrations of the previous studies. Based on the present biogeographic distribution of *P. glacialis* and the main earth environmental events since the Quaternary Period, its dispersal route and spatio-temporal pattern and the underlying earth environmental factors were tentatively inferred.【Results】The AT-rich sequences of 325 *P. glacialis* individuals from 13 geographic populations ranged from 487 to 495 bp in length with the mean of 491 bp, being relatively conserved in length. The main length difference of the AT-rich region lies in the Poly-T or Ploy-A copy number, and the mean A + T content of the region is up to 95.76%. Totally 239 halotypes based on mtDNA AT-rich sequences were found in the 325 individuals of the 13 populations of *P. glacialis*, with its haplotype diversity (*Hd*) value of 0.9971, the nucleotide polymorphism index π of 0.02948, and the Theta (per site) *Eta* value of 0.06594. The reconstructed phylogenetic trees and molecular dating showed that *P. glacialis* is most closely related to *P. stubbendorfii*, and these two sister species began to differentiate at about 7.49 million years (Ma) ago in the late Miocene. The ancestors of *P. glacialis* were originated in the southwest of China (near the Hengduan Mountain-Himalaya Mountain of the Qinghai-Tibet northeastern edge nowadays) at about 1.53 Ma ago; then, they dispersed from their originating site into Xiaolongshan and Qinling Mountains; later, they diverged into two main lineages with some inter-mingled halotypes along the mountainous routes, accompanied by the Quaternary glacial-interglacial changes; lastly, the one lineage continuously spread northeastward to Funiu, Songshan, Taishan, Kunyushan Mountains, and the other lineage spread step-by-step to Dabie, Langyashan, Zijinshan and Tianmushan Mountains.【Conclusion】The results of our phylogenetic analysis of *P. glacialis* indicate that no pronounced correlations exist between genetic differentiation and geographical distance judged from higher genetic variance within populations than between populations. In addition, we propose that the divergence of the two main lineages of *P. glacialis* occurred in the mountainous areas with relatively higher latitude in the Middle Pleistocene and then spread to the mountainous areas with relatively lower latitude in South and East China due to the Quaternary glacial-interglacial cycles and different dispersal routes.

Key words: *Parnassius*; *Parnassius glacialis*; mitochondrial genome; AT-rich region; phylochronology; genetic differentiation; phylogeography

绢蝶属 *Parnassius* 隶属于凤蝶科(Papilionidae)绢蝶亚科(Parnassinae),它们是蝶类中一个十分独特的类群,其中的绝大多数种类生活在高海拔的高原地带,特别是我国的青藏高原地区。由于长期对特殊地质、气候等环境的适应性进化,它们在形态和生理上逐渐产生了一系列高海拔环境的适应性特征,如耐低温、耐缺氧、和抗紫外线等(周尧, 1999; 武春生和徐堉峰, 2017)。目前,它们已成为昆虫物种形成与演化、适应性分子进化等研究领域十分难得的模式生物类群之一(夏琛琛, 2016; Carvalho *et al.*, 2017; Rytteri *et al.*, 2017; 王运良, 2017; 张敏等, 2017)。前期的有关研究表明,绢蝶属祖先很可能起源于第四纪早期(距今 20 Ma 左右)的我国西南部地区(现今青藏高原周边一带)(刘文萍,

1999；Tzedakis *et al*., 2002；Michel *et al*., 2008；王运良, 2017),之后,随着地球环境的不断演变和自身的快速适应辐射而向其他地区扩散。其中,冰清绢蝶 *Parnassius glacialis* 是我国境内分布海拔相对较低、分布地域相对广泛(西北、华中和华东的绝大部分地区)、也是唯一分布到我国江南地区的一种绢蝶属蝶类(周尧, 1999；武春生和徐堉峰, 2017)。迄今,关于其起源分化的时空格局及相关的地球环境背景尚不清楚,值得深入探讨。

昆虫的线粒体基因组通常是一类 15 ~ 16 kb 的双链环状 DNA 分子,具有分子量小、结构简单、组成稳定、母系遗传和进化速度快等特点,目前已成为探讨生物类群较低等级分类阶元间系统演化的理想工具之一(Wolstenholme, 1992；Boore, 1999；Nei and Kumar, 2000；Simon *et al*., 2006)。其中,AT 富集区(AT-rich region)或控制区(control region)是整个线粒体基因组序列和长度变异最大的区域,属非编码区,主要参与线粒体 DNA 复制和转录的调控。它们在进化过程中所受的选择压力较小,进化速率快,含有较为丰富的多态性。目前已被广泛应用于物种内部的分子系统学、分子进化学、种群遗传学和谱系生物地理学等研究领域(郭松长, 2006；朱文奇等, 2010；苏天凤和江世贵, 2011；Huang and Ke, 2014；Li *et al*., 2014；贾晓旭等, 2015；何海燕等, 2016；涂世英等, 2016；章明等, 2016)。

本研究尝试对采集于我国西北、华中以及华东等不同地域的 13 个冰清绢蝶地理居群共 325 头个体的线粒体基因组 AT 富集区序列进行 PCR 扩增、序列测定和比较分析;基于获得的序列数据,运用多种遗传分析方法估算群体间和群体内的遗传分化状况;同时,基于不同序列进化模型和多种建树方法重建它们的系统发生树,依据前期的分子定年研究结果以宽松分子钟方法估算各居群间的分歧时间,并结合第四纪以来我国的主要地球环境变化事件等地史资料,初步探讨冰清绢蝶在我国的起源、谱系生物地理分化格局及其地球环境成因。

1　材料与方法

1.1　实验材料

冰清绢蝶采集时间为 2008 –2016 年,采集地见表 1。标本采集后立即放入无水乙醇中固定,带回实验室放入 –80℃冰箱保存。本研究在每个地理居群所采集的样本中随机挑取各 25 头个体,分别编号 1 –25,用于实验分析。作为外群同样用于实验分析的绢蝶属其他 11 个种的 11 头个体标本的采集信息未列出。

1.2　冰清绢蝶线粒体基因组 AT 富集区序列扩增和测定

使用动物基因组快速抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司,上海),参照使用手册提取冰清绢蝶总基因组 DNA。参考 Simon 等(2006)并结合冰清绢蝶 12S rRNA 和 ND2 的基因序列保守区进行引物设计(王运良, 2017;线粒体全基因组序列已测出,尚未提交至 GenBank)：CR1F：5′-ATAATAGGGTATCTAATCCTAGT-3′；CR1R：5′-CCAATTCAACATCCCAATCA-3′。CR2F：5′-ATAGGGTATCTAATCCTAG-3′；　CR2R：5′-CTAATCCAATTCAACATCC-3′。用于扩增 12S rRNA、AT 富集区、$tRNA^{Met}$ 和 $tRNA^{Ile}$ 的一部分,产物长度约为 1.2 kb。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μL：Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.6 μL, Buffer (不含 Mg^{2+})6.0 μL, $MgCl_2$(25 mmol/L) 8.0 μL, dNTPs (2.5 mmol/L)1.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1.8 μL, DNA 模板(1.0 ng/μL)1.5 μL, ddH_2O 28.8 μL。PCR 反应条件：95℃预变性 5 min；然后 95℃变性 40 s, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min,共 35 个循环;再行 72℃总延伸 10 min。PCR 反应所用试剂均购于上海生工生物工程有限公司,PCR 扩增产物经分离纯化后由华大基因合肥世诚生物有限公司进行双向测序。

1.3　序列处理

将 1.2 节测序所得结果仔细与测序峰图核对校正,使用 Clustal X 2.1 (Larkin *et al*., 2007)对测序结果进行比对后拼接,然后在 NCBI 上使用 Blast 进行序列同源性搜索,以验证所得序列是否为目标片段。拼接后的序列以 Clustal X 2.1 进行序列多重比对和辅以人工校正,应用 MEGA 6.0 (Tamura *et al*., 2013)进行碱基含量以及多态位点分析,并基于 Kimura 双参数(Kimura 2-parameter, K-2P)模型计算居群间及居群内的遗传距离,利用 DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009)进行居群间及居群内的遗传多样性分析。

1.4　遗传距离及多样性分析

基于 DnaSP 5.10 统计分析冰清绢蝶 13 个地理居群 325 头个体的基于线粒体 AT 富集区序列单倍型个数、单倍型多样性(haplotype diversity, *Hd*)以及核苷酸多态性指数 π 等遗传多样性指标。应用

表 1 样本信息及基于线粒体基因组 AT 富集区序列的冰清绢蝶 13 个地理居群的单倍型、单倍型多样性和核苷酸多态性指数

Table 1 Sampling information and the estimated haplotype, haplotype diversity and nucleotide diversity of 13 geographic populations of *Parnassius glacialis* based on mitochondrial AT-rich sequences

样本采集地 Populations locality	居群代码 Population code	样本数 Number of samples	地理坐标 Geographic coordinates	单倍型 Haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity *Hd*	核苷酸多态性指数 Nucleotide polymorphism index π
江苏南京紫金山 Zijinshan, Nanjing, Jiangsu	ZJS	25	118.83°E, 32.06°N	19	0.953	0.02755
江苏连云港云台山 Yuntaishan, Lianyungang, Jiangsu	YTS	25	119.40°E, 34.71°N	13	0.940	0.01906
安徽六安天堂寨 Tiantangzhai, Liu′an, Anhui	TTZ	25	115.77°E, 31.17°N	20	0.965	0.03856
陕西宝鸡黄柏源 Huangbaiyuan, Baoji, Shaanxi	HBY	25	107.40°E, 33.73°N	20	0.973	0.02777
河南洛阳老君山 Laojunshan, Luoyang, Henan	LJS	25	111.66°E, 33.76°N	20	0.989	0.01505
浙江临安天目山 Tianmushan, Lin′an, Zhejiang	TMS	25	119.45°E, 30.34°N	16	0.985	0.02746
山东泰安泰山 Taishan, Tai′an, Shandong	TS	25	117.12°E, 36.25°N	16	0.983	0.02870
甘肃天水小陇山 Xiaolongshan, Tianshui, Gansu	XLS	25	105.68°E, 34.85°N	23	0.985	0.03873
安徽滁州琅琊山 Langyashan, Chuzhou, Anhui	LYS	25	118.29°E, 32.28°N	18	0.980	0.01844
湖北十堰牛头山 Niutoushan, Shiyan, Hubei	NTS	25	110.75°E, 32.62°N	22	0.984	0.03066
山东烟台昆嵛山 Kunyushan, Yantai, Shandong	KYS	25	121.73°E, 37.28°N	15	0.983	0.04107
湖北神农架 Shennongjia, Hubei	SNJ	25	110.35°E, 31.52°N	21	0.967	0.04039
河南郑州嵩山 Songshan, Zhengzhou, Henan	SS	25	113.05°E, 34.49°N	16	0.985	0.04199

Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010)中分子变异分析(analysis of molecular variance, AMOVA)以估算地理居群的遗传分化指数(*F*-statistics, *Fst*)以及居群间每世代的迁移数(number of migrants per generation, *Nm*);同时,基于获得的控制区单倍型序列,采用 DAMBE 7.0 (Xia, 2018)把其序列 fas 格式转换为 phy 格式,然后通过 NetWork 4.5.1 (Posada and Crandall, 2001)基于中间连接法(median joining)构建巢支图。

1.5 系统发育分析

本研究将获得的 13 个地理居群 325 条冰清绢蝶的 12S rRNA 部分序列、AT 富集区、$tRNA^{Met}$ 和 $tRNA^{Ile}$ 部分序列进行进行序列比对,删除 AT 富集区中不稳定的高变区,得到冰清绢蝶各居群的单倍型序列,然后以白绢蝶 *P. stubbendorfii*、珍珠绢蝶 *P. orleans* 等绢蝶属其他 11 个种作为外群,构建单倍型序列数据集 Data 1。运用最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建系统发生树。最大似然法分析时,先使用软件 PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002)和 ModelTest (Darriba *et al*., 2012)联合确定其最适进化模型(GTR + I + G),再通过 PhyML3.0 (Guindon *et al*., 2010)软件以非参数自展法重复抽样 1 000 次,获得系统树的拓扑结构和各节点的自展检验值(bootstrapping value);贝叶斯分析时,先将数据集的文件格式转变为 nex 文件格式并复制到软件 MrBayes 3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist *et al*., 2012)文件夹中,根据 Modeltest 估算

的最优碱基替代模型(GTR + I + G)设置参数,即 1set 设置替换模型 nst = 6(GTR 模型),位点速率变异模型设置为 rates = gamma(Gamma 分布),然后运行 4 条 MCMC 链,以随机树为起始树,共运行 100 万代,每 100 代抽样 1 次,重复 1 次,运算结果显示分列频率平均标准差小于 0.01 时,舍弃 2 500 代老化样本,剩余样本用于构建系统一致树,如果平均标准差没有小于 0.01,那么增加代数,继续运行。根据马尔科夫链的蒙特卡洛方法计算各节点的后验概率值(posterior probability)。

1.6　谱系发育年代学分析

依据系统发育分析过程中较为稳健的 BI 树,运用 BEAST V1.8.3 (Drummond and Rambaut, 2007)软件,基于宽松分子钟模型,使用贝叶斯算法运算构建冰清绢蝶系统发生过程中各不同居群分支事件的时间表。在分析过程中,结合本研究前期的研究结果(王运良, 2017),以绢蝶属的分化时间(19.81 Ma, CI: 24.2 – 15.4 Ma)设为系统树根部的时间界限,作为校正点①,以白绢蝶和珍珠绢蝶的分歧时间(12.24 Ma)为校正点②,并以白绢蝶和冰清绢蝶的分歧时间(7.49 Ma)作为分歧时间推测的校正点③,把上述 3 个时间校正点嵌入本研究 BI 树相应的节点位置,运行 10 000 000 代,生成 xml 文件。采用 Tracer 1.5 (Rambaut *et al*., 2014)打开 log. txt 文件评估运行结果,若有效取样数 ESS(effective sample size)值≥200,说明估算结果比较理想,否则,增加运行代数或者重新调整参数继续运行。运行结束后,将单次或多次生成的 fas. txt 格式文件添加到 BEAST v1.8.3 的子程序 Log Combiner vl.8.3 中进行合并,导出合并的文件(fas. tree 格式),运行 Tree annotator v1.8.3 把之前导出的 fas. tree 文件转换为 mcc. trees 格式文件;最后运用 FigTree v1.4.0 (http://tree.bio.ed.a-c.uk/software/figtree/)打开 BEAST 运行后生成的 mcc. tree 文件,获得绢蝶属各支系及冰清绢蝶不同居群的分歧时间。

2　结果

2.1　冰清绢蝶线粒体基因组 AT 富集区的序列组成及结构特征

本研究 13 个地理居群 325 头冰清绢蝶的线粒体 AT 富集区序列经校对后提交至 GenBank 中,登录号为 MH561389 – MH561713。AT 富集区序列长度介于 487 ~ 495 bp 之间(平均为 491 bp),其长度差异主要体现在 Poly(T) 或 Poly(A)的数目差异。T, C, A 和 G 4 种碱基的平均含量分别为 47.7%, 2.8%, 48.1% 和 1.4%, A + T 平均含量高达 95.76%(表 2)。对 325 头个体的线粒体 DNA AT 富集区序列比较分析发现,所有冰清绢蝶的 AT 富集区序列可以大体分为 5′端保守区、高变区、3′端保守区。5′端保守区在 $tRNA^{Met}$ 上游,长约 244 bp,其中包含一个典型的约 11 bp 的 Poly(A)结构,它们在所有蝶类中均非常保守。3′端保守区在 12S rRNA 下游,长度约 44 bp,此保守区包含一个“ATAGA(T)”和 18 ~ 20 bp 的 Poly(T)元件,这一结构在绝大多数蝶类中也广泛存在。

表 2　13 个不同地理居群的冰清绢蝶线粒体 DNA AT 富集区序列碱基组成
Table 2　Base composition of the mitochondrial AT-rich regions of 13 geographical populations of *Parnassius glacialis* in this study

居群代码 Population code	平均长度(bp) Average size	保守位点 Conserved site	变异位点 Variable site	T%	C%	A%	G%	(A + T)%
ZJS	492	434	59	48.2	2.4	48.2	1.2	96.3
YTS	490	433	62	49.2	2.7	46.7	1.4	95.9
TTZ	490	409	85	47.3	2.9	48.4	1.4	95.7
HBY	493	427	70	47.3	2.6	48.7	1.4	95.9
LJS	493	457	37	47.7	3.0	48.1	1.2	95.7
TMS	492	445	51	46.5	3.0	49.2	1.2	95.7
KYS	490	447	48	48.2	2.9	47.6	1.4	95.7
XLS	492	420	77	49.0	2.8	47.0	1.2	95.9
LYS	489	440	53	48.1	2.7	48.1	1.2	96.1
NTS	493	434	62	48.1	2.8	47.9	1.2	95.9
TS	492	401	95	46.5	2.8	49.4	1.2	95.9
SNJ	494	415	82	49.6	3.2	45.5	1.6	95.1
SS	490	411	87	47.3	2.9	47.8	2.0	95.1

居群代码信息见表 1;下同。Population codes are the same as in Table 1. The same below.

2.2 冰清绢蝶地理居群的遗传多样性

325 头冰清绢蝶的线粒体基因 AT 富集区序列比对后显示,几乎所有地理居群内都存在序列相同的现象,但没有发现完全共享单倍型,但小陇山单倍型 XLS 6 和 XLS 11 是小陇山、黄柏源、牛头山、神农架、老君山、天堂寨和天目山所共享单倍型(表 3)。所有序列经 DnaSP 5.10 软件分析,共检测出 239 个单倍型(haplotypes),单倍型多样性 *Hd* 为 0.9971,核苷酸多态性指数(nucleotide polymorphism index)π 值为 0.02948, Theta (per site) *Eta* 值为 0.06594。就地理居群内部而言,小陇山单倍型最多,多达 23 个,其次为牛头山(22)、神农架(21)和黄柏源(20),而云台山(13)单倍型最少;就单倍型多样性而言,老君山(0.989)、小陇山(0.985)和天目山(0.985)的单倍型多样性值较高,而云台山的单倍型多样性值最小(0.940);就核苷酸多态性而言,嵩山(0.04199)、昆嵛山(0.04107)和神农架(0.04039)π 值较大,而老君山(0.01505)π 值则较小(表 1)。这些结果表明,不同地理居群之间已经呈现一定程度的遗传分化,并且小陇山、黄柏源、牛头山和神农架居群可能为本研究 13 个地理居群的祖先居群。

本研究 AMOVA 分析结果显示,冰清绢蝶各居群之间 *Fst* 值大多在 0.15 ~ 0.25 之间,均值为 0.155。相比较而言,泰山与天目山居群和神农架与云台山居群 *Fst* 值较大,分别为 0.831 和 0.387,对应的 *Nm* 值分别为 0.051 和 0.396;而牛头山和小陇山居群、老君山和牛头山居群以及神农架和天堂寨居群 *Fst* 均较小,分别为 0.050, 0.066 和 0.069,其对应的 *Nm* 值分别为 4.750, 3.538 和 3.373(表 4)。巢支图的分析结果表明,单倍型 XLS 22, LJS 1 和 XLS 15 等均处于巢支图的主干(torso),且 XLS 22、LJS 1 与其他各居群之间联系密切。但各居群间相互交织在一起,并没有显示出明显的分化格局,因此这里未显示巢支图。

2.3 冰清绢蝶地理居群间的遗传距离

遗传距离分析表明(表 5),冰清绢蝶整个群体的平均遗传距离为 0.031,遗传相似系数为 0.969,居群间平均遗传距离为 0.033,居群内平均遗传距离为 0.027。琅琊山和云台山 2 个居群的居群内遗传距离最小(分别为 0.017 和 0.020),居群内部有较多的重复序列现象而存在相对较少的单倍型;而神农架和大别山天堂寨居群内遗传距离较大(分别为 0.038 和 0.033)。总体来说,居群内的遗传距离普遍小于居群间,但老君山居群较为特殊,其内部个体间的遗传距离(0.022)与其他居群之间的距离大体相当,甚至大于居群间的差异。

表 3 冰清绢蝶居群内和居群间具有相同 AT 富集区序列的个体列表

Table 3 The sampling individuals of the same AT-rich sequences within and between *Parnassius glacialis* populations

居群代码 Population code	个体数 Number of individuals	单倍型数目 Number of haplotypes	序列相同的个体代码 Code of the same sequence
ZJS	25	19	ZJS 1/6/7; ZJS 8/10/11/13/; ZJS 3/LYS 19; ZJS 17/TTZ 3
YTS	25	13	YTS 6/7/9/10/12/15/16/21; YTS 1/5/12/14/22/20
TTZ	25	20	TTZ 13/14; TTZ 2/6/10/24; TTZ 15/TMS 4/NTS 20/XLS 6/11/NTS 20/LJS 1/SNJ 2/HBY 4; TTZ 25/NTS 23/HBY 25; TTZ 1/4/SNJ 1
HBY	25	20	HBY 11/12/14; HBY 1/3/6; HBY 15/17;HBY 4/XLS 6/11/NTS 20/LJS 1/SNJ 2/TTZ 15/TMS 4
LJS	25	20	LJS 2/7/17; LJS 3/6/20; LJS 21/XLS 18/NTS 7; LJS 1/SNJ 2/XLS 6/11/NTS 20/HBY 4/TTZ 15/TMS 4; LJS 14/SS 8
TMS	25	16	TMS 1/2/3/5/; TMS 12/13/20; TMS 6/7/8/9/10;TMS 4/XLS 6/11/NTS 20/LJS 1/SNJ 2/HBY 4/TTZ 15
TS	25	16	TS 14/11; TS 6/7/8/9/10; TS 1/2/3; TS 20/22/; TS 23/25
XLS	25	23	XLS 1/4; XLS 6/11/NTS 20/LJS 1/SNJ 2/HBY 4/TTZ 15/TMS 4; XLS 12/SNJ 3/NTS 17
LYS	25	18	LYS 1/3/5; LYS 8/10/11/12/13/15; LYS 19/NJ 6; LYS 16/LYG 17
NTS	25	22	NTS 6/7/10; NTS 8/9; NTS 24/SNJ 16; NTS 20/XLS 6/11/LJS 1/SNJ 2/HBY 4/TTZ 15/TMS 4
KYS	25	15	KYS 1/2/4/5; KYS 3/13/SS 18; KYS 11/12/15; KYS 24/23; KYS 6/7/9/10; KYS 18/YTS 18
SNJ	25	21	SNJ 6/11/12; SNJ 3/4/7; SNJ 1/TTZ 1/TTZ 4/LYS 6; SNJ 2/XLS 6/11/NTS 20/LJS 1/HBY 4/TTZ 15/TMS 4
SS	25	16	SS 1/2/3/4/5; SS 6/7/9/10; SS 13/14/18/19

居群代码后的数字示个体编号。The numerals following the population code indicate the individual no.

表 4 冰清绢蝶两两居群间的遗传分化指数(*Fst*)和基因流(*Nm*)

Table 4 The *Fst* values and the gene flow (*Nm*) for pariwise difference of *Parnassius glacialis* populations in this study

居群代码 Population code	*Fst*-inter	ZJS	YTS	TTZ	HBY	LJS	TMS	TS	XLS	LYS	NTS	KYS	SS	SNJ
ZJS	0.501		1.238	0.080	0.800	2.438	1.322	1.247	1.869	2.250	1.833	1.462	1.486	0.643
YTS	0.498	0.168		0.541	0.529	1.451	0.907	0.832	1.059	1.284	1.313	0.964	0.856	0.396
TTZ	0.514	0.188	0.316		1.887	0.612	1.406	1.630	2.955	1.080	1.313	3.128	2.467	3.373
HBY	0.531	0.238	0.321	0.117		0.541	1.293	2.915	1.816	0.809	0.964	1.221	1.833	1.602
LJS	0.538	0.093	0.147	0.290	0.316		1.238	0.892	1.451	1.816	3.538	1.221	1.124	0.404
TMS	0.524	0.159	0.216	0.151	0.162	0.168		0.051	2.467	2.250	1.688	2.382	2.438	0.814
TS	0.512	0.167	0.231	0.133	0.079	0.219	0.831		2.528	1.486	1.869	1.943	2.799	1.332
XLS	0.526	0.118	0.191	0.078	0.121	0.147	0.092	0.090		2.528	4.750	2.382	2.591	1.562
LYS	0.504	0.100	0.163	0.188	0.236	0.121	0.100	0.144	0.090		2.599	2.275	2.065	0.633
NTS	0.526	0.120	0.160	0.160	0.206	0.066	0.129	0.118	0.050	0.089		2.726	2.108	0.775
KYS	0.528	0.146	0.206	0.074	0.170	0.170	0.095	0.114	0.095	0.099	0.084		2.762	1.406
SS	0.522	0.144	0.226	0.092	0.120	0.182	0.093	0.082	0.088	0.108	0.106	0.083		1.486
SNJ	0.531	0.280	0.387	0.069	0.135	0.382	0.235	0.158	0.138	0.283	0.244	0.151	0.144	

Fst-inter：各居群内部的遗传分化指数 The *Fst* values of the internal population. 对角线下方为遗传分化指数(*Fst*)，对角线上方为基因流(每世代迁移数，*Nm*)。The *Fst* values of the difference between groups are shown below the diagonal, and the *Nm* (migrants per generation, *Nm*) values are shown above the diagonal.

表 5 冰清绢蝶 13 个地理居群的遗传距离(基于 Kimura 双参数模型)

Table 5 The genetic distance matrices among 13 geographical populations of *Parnassius glacialis* in this study based on Kimura-2 parameter model

居群代码 Population code	组内 Intra-population	组间 Inter-population											
		ZJS	YTS	TTZ	HBY	LJS	TMS	TS	XLS	LYS	NTS	KYS	SS
ZJS	0.027												
YTS	0.020	0.029											
TTZ	0.033	0.038	0.029										
HBY	0.023	0.033	0.033	0.031									
LJS	0.022	0.021	0.020	0.031	0.026								
TMS	0.023	0.030	0.028	0.032	0.027	0.021							
TS	0.025	0.032	0.030	0.034	0.025	0.024	0.026						
XLS	0.031	0.034	0.033	0.034	0.030	0.026	0.030	0.030					
LYS	0.017	0.025	0.023	0.030	0.025	0.016	0.022	0.024	0.026				
NTS	0.029	0.033	0.03	0.037	0.032	0.024	0.028	0.031	0.033	0.026			
KYS	0.030	0.035	0.033	0.036	0.033	0.027	0.031	0.032	0.033	0.027	0.034		
SS	0.031	0.037	0.036	0.038	0.033	0.030	0.032	0.033	0.036	0.029	0.036	0.037	
SNJ	0.038	0.045	0.045	0.038	0.034	0.039	0.038	0.036	0.039	0.036	0.043	0.042	0.041

2.4 冰清绢蝶地理居群的系统发生分析

13 个地理居群 325 条冰清绢蝶的 12S rRNA 部分序列、AT 富集区、$tRNA^{Met}$ 和 $tRNA^{Ile}$ 部分序列拼接后的总长度为 882 ~ 892 bp，比对后删除 AT 富集区中不稳定高变区后，经拼接得到总长为 693 bp 的数据集，共获得了 113 条单倍型序列。以白绢蝶等其他 11 个绢蝶种类作为外群(GenBank 登录号：MH561714 – MH561724)，构建系统发生树。

系统发生分析显示，尽管 ML 树的自展值和 BI 树的后验概率值不够理想，但二种方法构建的 ML 树和 BI 树拓扑结构基本一致。冰清绢蝶 13 个居群明显分化为 2 大演化分支，第Ⅰ支系主要包括天水小陇山、秦岭黄柏源、十堰牛头山和湖北神农架等地的居群；第Ⅱ支系主要包括郑州嵩山、六安天堂寨、临安天目山、滁州琅琊山、南京紫金山、连云港云台山、泰安泰山和烟台昆嵛山等地的居群，在第Ⅱ支系

中,天堂寨、琅琊山、紫金山和天目山居群大体聚在一起成为一个小支系,而老君山、嵩山、泰山、昆嵛山和云台山居群大体聚在一起为一个小支系,且两个小支系内部存在部分混杂情况,如 TTZ 3 与老君山居群聚在一起,ZJS 12 和 ZJS 14 与云台山和泰山居群聚在一起,同样地,KYS 6, KYS 8, KYS 21 和 YTS 2, YTS 3, YTS 4 与琅琊山、紫金山等居群关系较为密切(图 1, 2)。

2.5 冰清绢蝶地理居群的谱系发育年代学分析

谱系年代学结果表明,本研究中所列的绢蝶属形成时间约在中新世早期[距今 20.24 百万年(Ma), 95%置信区间: 距今 24.2 – 15.4 Ma],冰清绢蝶和白绢蝶为近缘姊妹种,二者的最近共同祖先在距今约 7.52Ma 的中新世晚期开始分化。冰清绢蝶的形成时间约为第四纪更新世早期(距今 1.53 Ma, 95%置信区间:距今 2.54 – 0.51 Ma),第Ⅰ大支系各群体形成和群体间分歧时间大多在更新世早期(距今 1.53 – 1.14 Ma),第Ⅱ大支系形成并分歧的时间主要在更新世中晚期(0.81 – 0.28 Ma),两大支系扩张交流的时间主要在更新世中期(距今 1.14 – 0.81 Ma)。冰清绢蝶的形成时间、两大支系的分化时间与扩张交流时间都在第四纪冰期中的冰期间冰期的轮回事件之内(图 2)。

2.6 冰清绢蝶扩散路径分析

依据现今中国冰清绢蝶的地理分布,结合本研究冰清绢蝶各居群的谱系演化、分歧时间及其遗传分化状况的结果,冰清绢蝶祖先可能于我国原西南地区(现青藏高原东北缘及横断山脉一带)(汪学俭等, 2013; 张亚玲等, 2015; 王运良, 2017),在距今约 1.53 Ma 的渐新世时期开始形成和分化,之后沿着秦岭山系进行扩散。随着第四纪的冰期-间冰期轮回事件,冰清绢蝶从秦岭山系向东北、东南形成 2 大支系迁移到大别山系和伏牛山系,并沿着这些山系继续向南或向东迁移,向南甚至到达到宁镇山脉(天目山、紫金山),向东到达泰山山脉(泰山、昆嵛山、云台山等处)(图 3)。

3 讨论

昆虫线粒体基因组 AT 富集区属于不编码基因,在进化过程中所承受的选择压力较小,同时,和线粒体基因组其他部分相比,其进化速率较快,种间甚至种内间变异明显,因此,它们在亲缘关系较近的种间系统分类、种群分化和种内遗传多样性等研究中作为有效的分子标记而被广泛运用(Wolstenholme, 1992; Hao *et al*., 2013; 王维等, 2013; Kim *et al*., 2014; 何海燕等, 2016)。本研究表明,冰清绢蝶的线粒体 AT 富集区序列具有绝大多数鳞翅目的典型特征,如 ATAGA(T)引导的 Ploy T 结构、(AT)n 或者(TA)n 元件以及 3′端的 Poly(A)结构等(Hao *et al*., 2013; 王维等, 2013; Chen *et al*., 2014; Wang *et al*., 2015)。虽然其序列长度相对较短,但在居群间和居群内仍存在较为丰富的多态性,是探讨冰清绢蝶群体遗传分化和谱系发生较为理想的分子标记之一。

本研究显示冰清绢蝶的单倍型多样性 *Hd* 为 0.9971,核苷酸多态性指数 π 值为 0.02948(表 1)。依据 Grant 和 Bowen(1998) 等的观点,即 $Hd \geq 0.5$, $\pi \geq 0.005$ 时,表示种群进化历史较为悠久,种群较为稳定。因而,冰清绢蝶在我国可能经过了较为漫长的进化历史,才得以形成当今的地理分布格局。另外,本研究估算的冰清绢蝶的平均 *Fst* 值为 0.155,依据 Wright(1990) 提出的观点,即 *Fst* 为 0.15 ~ 0.25 时,说明群体间遗传分化相对较大,则中国冰清绢蝶有一定的遗传分化,其遗传分化主要来自居群内部。本研究 13 个居群的 *Nm* 平均值为 1.50,绝大部分两两居群间的基因流 *Nm* 值都 >1,表明居群间存在一定的基因交流。值得注意的是小陇山和牛头山居群间以及老君山和牛头山居群间的 *Nm* 值分别为 4.750 和 3.538,表明这些居群间存在较为明显的基因交流,应与秦岭山系和伏牛山系间近距离扩散有关;同样,神农架和天堂寨居群间也存在类似的现象(*Nm* 值为 3.373),可能与秦岭山系和大别山系相互交流和扩散有关。

冰清绢蝶居群间的平均遗传距离(0.033)略大于居群内平均遗传距离(0.031)。但老君山居群内差异以及该居群与其他居群间的遗传距离没有明显差异,特别是与小陇山、牛头山、嵩山、泰山等居群间的差异甚至小于其居群内部差异,表明其遗传分化多在居群内部(表 4)。同时,本研究的巢枝图(未显示)也表明各居群间相互交织在一起,没有明显的分化格局。最后,从系统发生树(图 1, 2)来看,尽管老君山居群的 LJS 9, LJS 17 和 LJS 25 单倍型与第Ⅰ支系相互聚在一起,而黄柏源居群的 HBY 4, HBY 14 和牛头山居群的 NTS 10 和 NTS 15 以及神农架的 SNJ 18 与第Ⅱ支系聚集在一起,但总体来看,冰清绢蝶大体上仍分化为 2 大支系。

上述结果提示,在第四纪冰期-间冰期的轮回事

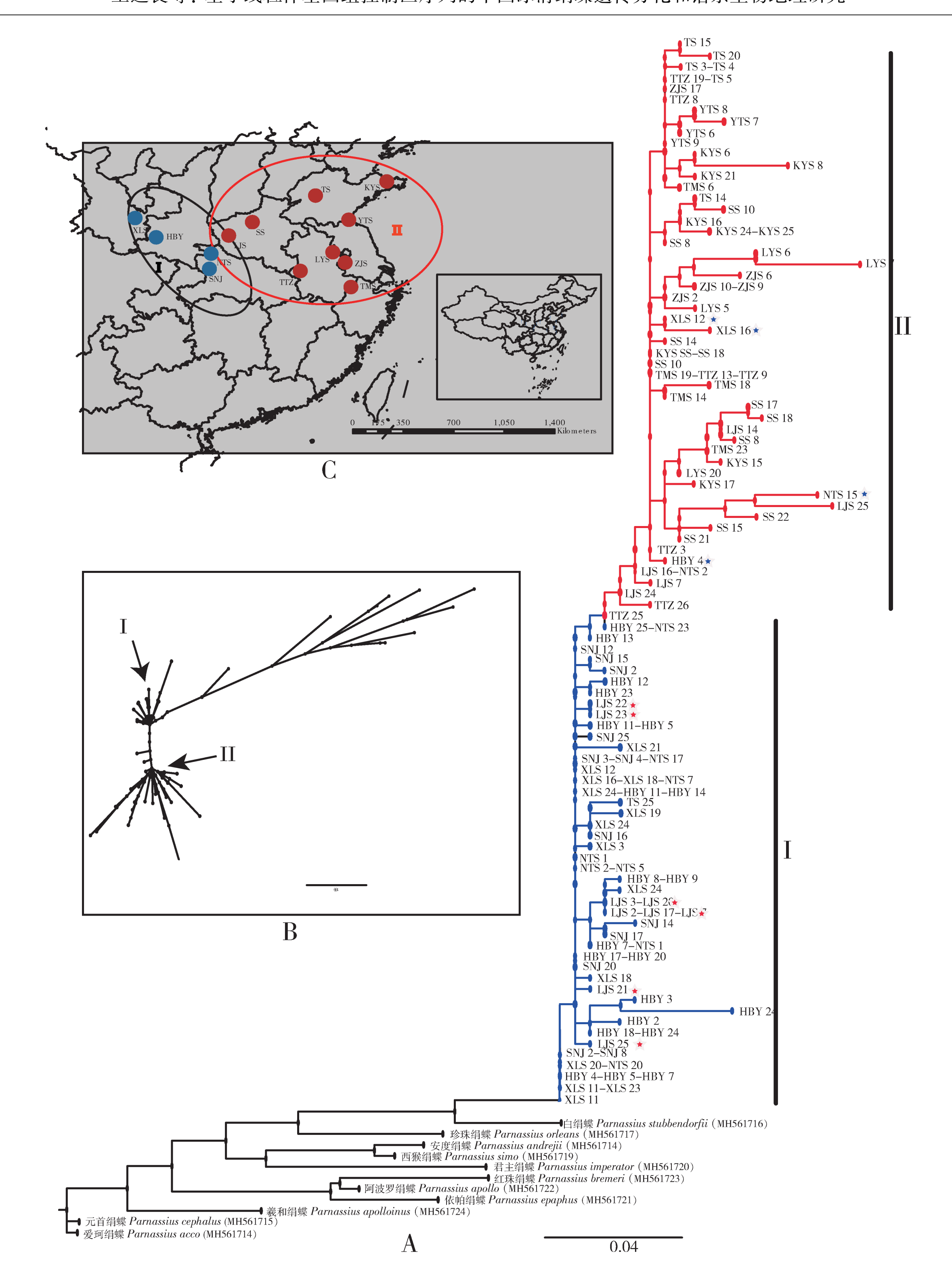


图 1　基于 Data 1 构建中国冰清绢蝶 13 个地理居群 ML 系统发生树

Fig. 1　The ML tree of the 13 geographic populations of *Parnassius glacialis* in China based on Data 1

A：矩形树，星号示集群中交叉的单倍型 Rectangular tree, stars indicating the hylotypes affiliated to different lineages；B：放射树 Radical tree；C：Ⅰ和Ⅱ两大集群在地图上位置，其中Ⅰ主要为黄柏源、小陇山、牛头山和神农架居群，Ⅱ主要为天堂寨、紫金山、琅琊山、天目山、嵩山、老君山、泰山、昆嵛山和云台山居群 Two lineages (Ⅰ and Ⅱ) on the map. The lineage Ⅰ includes the populations HBY, XLS, NTS and SNJ, while the lineage Ⅱ includes the populations TTZ, ZJS, LYS, TMS, SS, LJS, TS, KYS and YTS. Data 1 为 12S rRNA 部分序列、AT 富集区序列、tRNA^{Met}和 tRNA^{Ile}部分序列构成的序列集合。地图文件信息来自国家基础地理信息中心（http://ngcc.sbsm.gov.cn/）。XLS 11 为冰清绢蝶天水小陇山居群 11 号个体的序列代码，其余类推。Data 1 is the dataset of combined 12S rRNA gene partial sequence, AT-rich region sequence, tRNA^{Met} gene partial sequence and tRNA^{Ile} gene partial sequence. The map information is from the National Geomatics Center of China (http://ngcc.sbsm.gov.cn/). XLS 11 is the sequence code of the No. 11 individual of the Xiaolongshan population of *P. glacialis*, and the others may be deduced by analogy. 图 2 同 The same for Fig. 2.

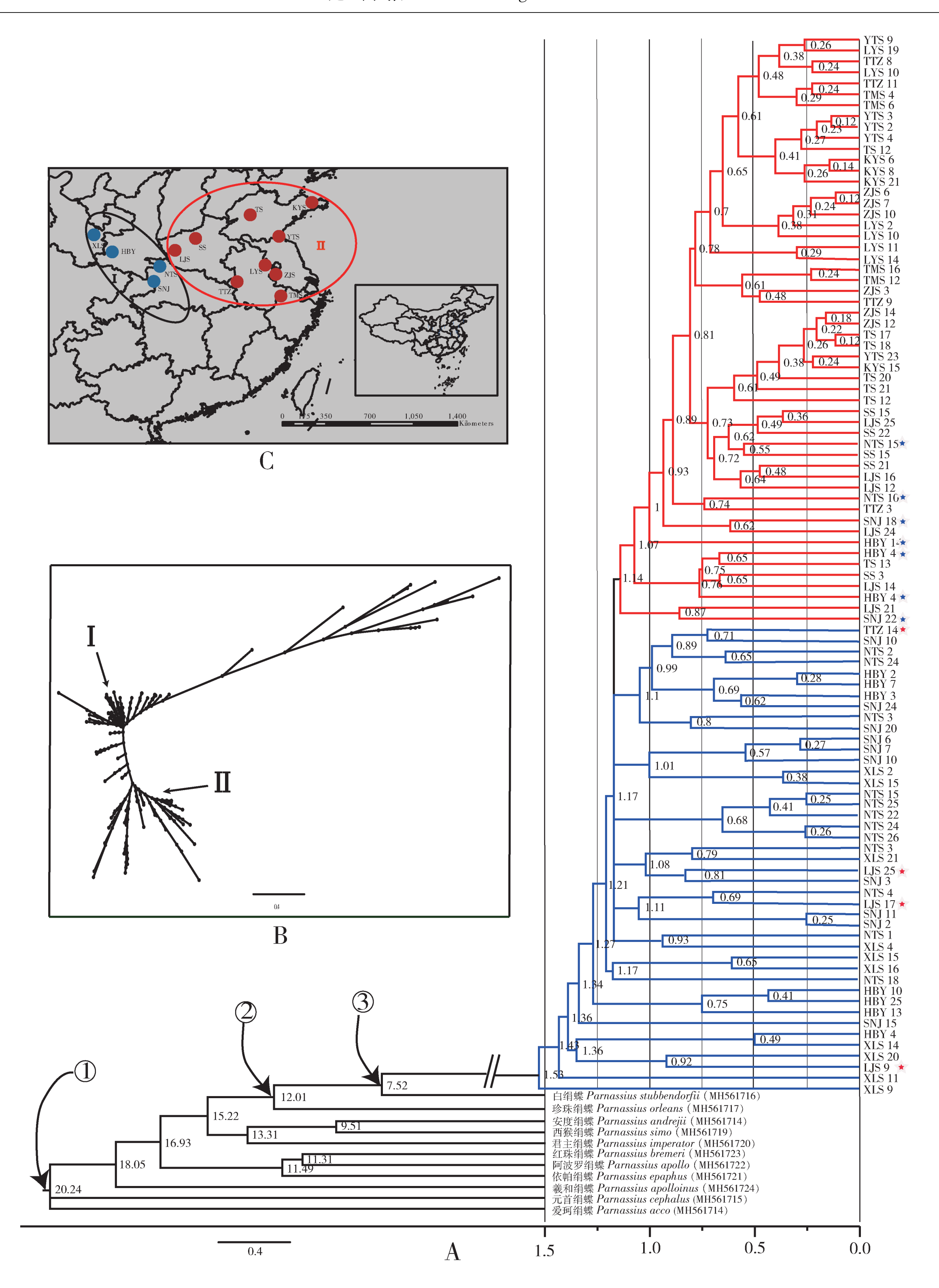


图 2 基于 Data 1 构建中国冰清绢蝶 13 个地理居群 BI 系统发生树和谱系发育年代图

Fig. 2 The BI tree and phylochronological chart of 13 geographic populations of *Parnassius glacialis* in China based on Data 1

A 图中节点数值示分歧时间，①，②和③箭头所示为分子钟校正点位置。The nodal values show the divergence time in Fig. A. ①, ② and ③ represent the calibration points of molecular clock.

件中，天水小陇山、秦岭黄柏源、十堰牛头山和神农架等地的冰清绢蝶居群基因交流明显，且它们在聚类中并没有很好区分开，因而，这一地区是冰清绢蝶起源和分化的中心地区。另外，本研究显示，河南老君山居群的部分单倍型在系统树的 2 个支系中都有分布，因而老君山居群可能是我国冰清绢蝶发生频

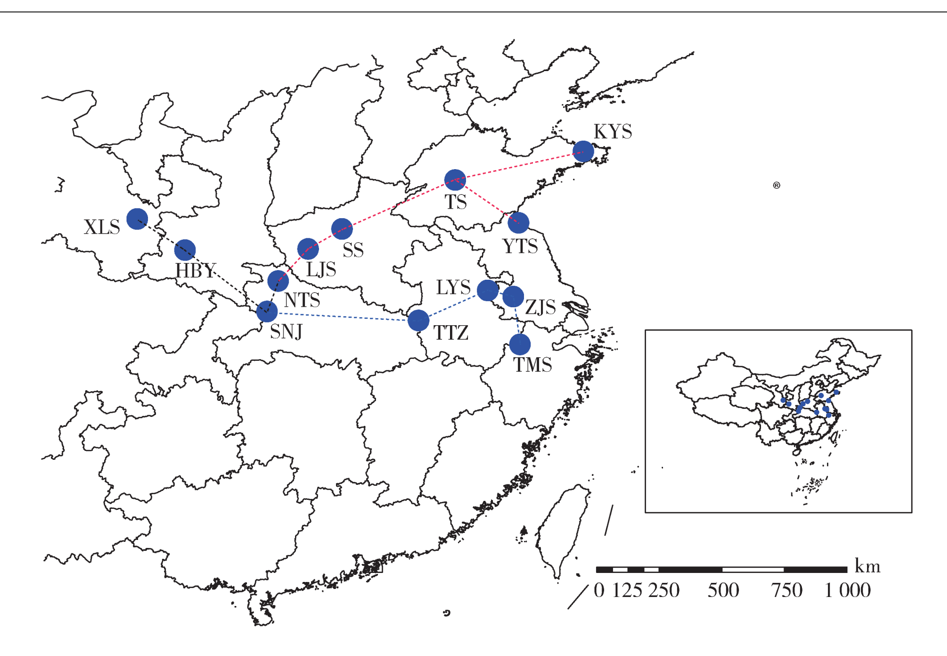


图 3　中国冰清绢蝶扩散路径示意图

Fig. 3　Schematic diagram of the dispersal route of *Parnassius glacialis* in China

地图信息来自国家基础地理信息中心(http://ngcc. sbsm. gov. cn)。The map information is from the National Geomatics Center of China (http://ngcc. sbsm. gov. cn).

繁交流的交汇中心之一。再者,虽然在后续的分化过程中,大别山天堂寨居群和琅琊山、天目山、紫金山居群构成一个小的支系,而老君山居群与嵩山、泰山、云台山、昆嵛山等居群构成另一个小支系。但上述 2 个小支系的居群间均存在部分相同的单倍型,尤其是位于江苏连云港的云台山居群,尽管其单倍型较少,但很明显的与两支系都有交叉,在老君山等居群构成的小支系中,云台山居群与昆嵛山居群聚在一起,而在大别山天堂寨等居群中构成的另一支小支系中,云台山居群与紫金山、天目山居群亲缘关系较近,因而,云台山居群应与紫金山居群和昆嵛山等居群也发生了某种程度的基因交流。

第四纪以全球气候显著变冷为其重要特点,且形成多次冰期-间冰期的轮回,这种气候剧烈波动,引起了生物大规模的迁移,甚至是生存灾难(Andel and Tzedakis, 1996; 陈冬梅等, 2011)。前期的分子钟研究标明,绢蝶属可能起源于古近纪晚期或新近纪早期(距今 35 – 17 Ma)的我国西南地区,现今的横断山脉一带(汪学俭等, 2013; 张亚玲等, 2015; 王运良, 2017),中新世(距今 23 – 5 Ma)以来,我国的喜马拉雅造山运动加剧,青藏高原快速抬升,天山、秦岭等山系也继续抬升,绢蝶并产生了一些适应高海拔环境的特性,如翅被毛、耐寒、耐低氧等特征。之后,随着栖息环境的快速变化和种间竞争的加剧,绢蝶属发生快速适应性分化;在距今约 7.5 Ma 的中新世后期,冰清绢蝶和其姊妹种白绢蝶的共同祖先开始发生分化,距今约 1.7 Ma 的渐新世早期,冰清绢蝶这一物种最终形成并开始分化。

随后而来的第四纪(距今 2.6 Ma –)冰期-间冰期轮回事件、寄主植物的扩散及其他地球环境事件(孙航, 2002; Zhang *et al.*, 2016),引起冰清绢蝶不断地扩散、隔离以及种群间的相互混杂现象。特别是,当冰期来临时,其寄主植物(延胡索 *Corydalis yanhusuo* 或黄堇 *Corydalis pallida*)向南方或向低海拔的地方退缩;当间冰期期间,海平面上升,温度升高,植物再向北方或高海拔地方扩散,而绢蝶和其他生物一样,随着其寄主植物一起来回迁移。结合本研究冰清绢蝶各居群的聚类情况、分歧时间及其分布来看,冰清绢蝶祖先可能先从横断山脉附近经青藏高原东北缘扩散到秦岭一带,之后沿东北和东南向二条主要路径由秦岭地区逐渐向其他低海拔地区扩散(其中,距今约 1.8 Ma,随着第四纪冰期的不断发展,因海平面下降和陆桥的形成等事件而由中国大陆沿海区域扩散到日本地区,并随后由于日本海的渐进扩张而导致的地理隔离逐渐分化为一个新的亚种(Yagi *et al.*, 2001))。

随着第四纪冰期的持续发展,尤其是在西夏邦马冰期(Shishapangma Glaciation)(距今 1.17 – 0.8 Ma),温度持续下降,寄主植物可能在这一时期得以向低纬度或低海拔地区扩张,冰清绢蝶也得以从秦

岭山系向大别山系和伏牛山系扩散，这一时间段恰好与冰清绢蝶第 1 大支系和第 2 支系扩张交流的时间（距今 1.14 – 0.81 Ma）相吻合而得以相互验证。随后，随着望坤冰期（Wangkun Glaciation）（距今 0.76 – 0.5 Ma）地球温度的急剧降低，冰川面积扩大，高纬度或高山高原的生物继续向低纬度、低海拔地区或向南迁移，望坤冰期后，随之而来的是第四纪冰期中时间最长的一次间冰期，持续时间近 100 Ka，这期间，由于温度升高，海平面上升，冰清绢蝶开始向高纬度或高海拔地区迁移，也有一部分遗留在低海拔的高山地区（如天目山、云台山、昆嵛山、泰山等地），同时，这次间冰期可能促使了伏牛山系和大别山系的冰清绢蝶进行了基因交流。随后又伴随着多次冰期-间冰期轮回和东南季风事件（Zhang *et al*., 2016），宁镇山脉的种群也和泰山山脉的种群也发生了进一步交流。

综合多方面证据分析，冰清绢蝶不同居群间的扩散路径与山脉分布、走向以及地理隔离等存在明显的相关性，并受到第四纪至今的气候变化、生物环境等因素的影响，才最终形成了今天的冰清绢蝶分布格局。

参考文献（References）

Andel THV, Tzedakis PC, 1996. Palaeolithic landscapes of Europe and environs, 150,000 – 25,000 years ago: an overview. *Quat. Sci. Rev*., 15(5 – 6): 481 – 500.

Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*., 27(8): 1767 – 1780.

Carvalho APS, Orr AG, Kawahara AY, 2017. A review of the occurrence and diversity of the sphragis in butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea). *ZooKeys*, 694: 41 – 70.

Chen DM, Kang HZ, Liu CJ, 2011. An overview on the potential Quaternary Glacial refugia of plants in China mainland. *Bull. Bot. Res*., 31(5): 623 – 632. ［陈冬梅，康宏樟，刘春江，2011. 中国大陆第四纪冰期潜在植物避难所研究进展. 植物研究，31(5): 623 – 632］

Chen YH, Huang DY, Wang YL, Zhu CD, Hao JS, 2014. The complete mitochondrial genome of the endangered Apollo butterfly, *Parnassius apollo* (Lepidoptera: Papilionidae) and its comparison to other Papilionidae species. *J. Asia-Pac. Entomol*., 17(4): 663 – 671.

Chou I, 1999. Monographia Rhopalocerorum Sinensium. Henan Science and Technology Press, Zhengzhou. 191 – 210. ［周尧，1999. 中国蝶类志. 郑州：河南科学技术出版社. 191 – 210］

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*, 9(8): 772 – 777.

Drummond AJ, Rambaut A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol*., 7(1): 214 – 221.

Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour*., 10(3): 564 – 567.

Grant WS, Bowen BW, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered*., 89(5): 415 – 426.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O, 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol*., 59(3): 307 – 321.

Guo SC, 2006. Study on Genetic Diversity, Origin and Taxonomic Status of Yak (*Bos grummiens*): Implications from Analyses of mtDNA D-loop Fragment Sequences. PhD Dissertation, Chinese Academy of Sciences, Beijing. ［郭松长，2006. 牦牛遗传多样性、起源驯化及分类学地位研究——线粒体 DNA D-loop 序列的分析. 北京：中国科学院大学博士学位论文］

Hao J, Sun M, Shi Q, Sun X, Shao L, Yang Q, 2013. Complete mitogenomes of *Euploea mulciber* (Nymphalidae: Danainae) and *Libythea celtis* (Nymphalidae: Libytheinae) and their phylogenetic implications. *ISRN Genomics*, 2013: 491636.

He HY, Yu WD, Jiang WB, 2016. Research progress in mitochondrial genomics of butterflies. *Chin. Bull. (Life Sci.)*, 28(9): 978 – 985. ［何海燕，俞伟东，蒋韦斌，2016. 蝶类线粒体基因组学研究进展. 生命科学，28(9): 978 – 985］

Huang Z, Ke D, 2014. Structure and evolution of the Phasianidae mitochondrial DNA control region. *Mitochondrial DNA Part A*, 27: 350 – 354.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8): 754 – 755.

Jia XX, Tang XJ, Lu JX, Gu R, Ge QL, Gao YS, Su YJ, 2015. Investigation of genetic diversity and evolution of Tibetan chicken based on complete mitochondrial DNA D-loop region sequence. *J. Northeast Agric. Univ*., 46(2): 32 – 36. ［贾晓旭，唐修君，陆俊贤，顾荣，葛庆联，高玉时，苏一军，2015. 基于线粒体 DNA D-loop 区全序列分析藏鸡遗传多样性及其起源进化关系的研究. 东北农业大学学报，46(2): 32 – 36］

Kim MJ, Wang AR, Park JS, Kim I, 2014. Complete mitochondrial genomes of five skippers (Lepidoptera: Hesperiidae) and phylogenetic reconstruction of Lepidoptera. *Gene*, 549: 97 – 112.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947 – 2948.

Li L, Zhang H, Sun D, Gao T, 2014. Structure of mitochondrial DNA control region of *Pholis fangi* and its phylogenetic implication. *J. Ocean Univ. China*, 13: 491 – 496.

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451 – 1452.

Liu WP, 1999. A review of *Parnassius*. *Entomol. Knowl.*, 36(6): 360 - 363. [刘文萍, 1999. 绢蝶属 *Parnassius* 述评. 昆虫知识, 36(6): 360 - 363]

Michel F, Rebourg C, Cosson E, Descimon H, 2008. Molecular phylogeny of Parnassiinae butterflies (Lepidoptera: Papilionidae) based on the sequences of four mitochondrial DNA segments. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 44(1): 1 - 36.

Nei M, Kumar S, 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333 pp.

Posada D, Crandall KA, 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.*, 16(1): 37 - 45.

Rambaut A, Suchard MA, Xie D, 2014. Tracer v1. 6. Available at http://treebioedacuk/software/tracer/.

Ronquist F, Teslenko M, Mark PVD, Ayres DL, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3. 2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.*, 61(3): 539 - 542.

Rytteri S, Kuussaari M, Saastamoinen M, Ovaskainen O, 2017. Can we predict the expansion rate of a translocated butterfly population based on a priori estimated movement rates? *Biol. Conserv.*, 215: 189 - 195.

Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 545 - 579.

Su TF, Jiang SG, 2011. Structure and phylogenetic analysis of mitochondrial DNA control region of genus *Trachurus*. *South China Fish. Sci.*, 7(1): 18 - 25. [苏天凤, 江世贵, 2011. 竹筴鱼属鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析. 南方水产科学, 7(1): 18 - 25]

Sun H, 2002. Tethys retreat and Himalayas-Hengduanshan Mountains uplift and their significance on the origin and development of the Sino-Himalayan elements and alpine flora. *Acta Bot. Yunnan.*, 24(3): 273 - 288. [孙航, 2002. 古地中海退却与喜马拉雅-横断山的隆起在中国喜马拉雅成分及高山植物区系的形成与发展上的意义. 云南植物研究, 24(3): 273 - 288]

Swofford DL, 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0b10. Mac Version. 137 pp.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725 - 2729.

Tu SY, Wang Q, Zhong JC, 2016. Analysis on genetic diversity and phyletic evolution of mitochondrial DNA D-loop region from Zhongdian Yak. *Chin. Herb. Sci.*, 36(3): 5 - 10. [涂世英, 汪琦, 钟金城, 2016. 中甸牦牛 mtDNA D-Loop 区遗传多样性及系统进化分析. 中国草食动物科学, 36(3): 5 - 10]

Tzedakis PC, Lawson IT, Frogley MR, Hewitt GM, Preece RC, 2002. Buffered tree populations changes in a Quaternary refugium: implications for speciation. *Science*, 297(5589): 2044 - 2047.

Wang W, Meng ZQ, Shi FX, Li FB, 2013. Advances in comparative mitogenomic studies of Lepidoptera (Arthropoda: Insecta). *Chin. Sci. Bull.*, 58(30): 3017 - 3029. [王维, 孟智启, 石放雄, 李凤波, 2013. 鳞翅目昆虫比较线粒体基因组学研究进展. 科学通报, 58(30): 3017 - 3029]

Wang XJ, Ding CZ, Jin DC, 2013. Reaserch status of origin and evolution of butterflies. *J. Mount. Agric. Biol.*, 32(6): 547 - 552. [汪学俭, 丁翠珍, 金道超, 2013. 蝴蝶进化与起源的研究现状. 山地农业生物学报, 32(6): 547 - 552]

Wang YL, 2017. Mitogenomic Phylogeny of the Main Lineages of Butterflies (Lepidoptera: Arthropoda: Insecta) and the Phylogeography of *Parnassius glacialis* Based on the Mitochondrial D-loop Regions. PhD Dissertation, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui. [王运良, 2017. 蝶类(鳞翅目, 双孔次亚目)主要分类群的谱系发育和中国冰清绢蝶谱系地理研究. 安徽芜湖: 安徽师范大学博士学位论文]

Wang YL, Chen YH, Xia CC, Xia XQ, Tao RS, Hao JS, 2015. The complete mitochondrial genome of the common red apollo, *Parnassius epaphus* (Lepidoptera: Papilionidae: Parnassiinae). *J. Asia-Pac. Entomol.*, 18(2): 239 - 248.

Wolstenholme DR, 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 173 - 216.

Wright SG, 1990. Evolution in mendelian population. *Bull. Math. Biol.*, 52(1 - 2): 241 - 295.

Wu CS, Xu YF, 2017. Butterflies of China. The Straits Publishing & Distributing Group, Fuzhou. 244 - 289. [武春生, 徐堉峰, 2017. 中国蝴蝶图鉴. 福州: 海峡书局出版社. 244 - 289]

Xia CC, 2016. The Complete Mitochondrial Genomes of six *Parnassius* Butterfly Species and the Relevant Phylogenetic and Phylochronological Analysis. MSc Thesis, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui. [夏琛琛, 2016. 六种绢蝶线粒体基因组及绢蝶属谱系发育和谱系年代分析. 安徽芜湖: 安徽师范大学硕士学位论文]

Xia X, 2018. DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6): 1550 - 1552.

Yagi T, Katoh T, Chichvarkhin A, Shinkawa T, Omoto K, 2001. Molecular phylogeny of butterflies *Parnassius glacialis* and *P. stubbendorfii* at various localities in East Asia. *Genes Genet. Syst.*, 76(4): 229 - 234.

Zhang M, Jia XX, Lu JX, Tang XJ, Fan YF, Gao YS, 2016. The genetic diversity and systematic evolution of Wenchang chickens based on the mitochondrial DNA D-loop sequence. *J. Anhui Agric. Univ.*, 43(5): 690 - 693. [章明, 贾晓旭, 陆俊贤, 唐修君, 樊艳凤, 高玉时, 2016. 文昌鸡线粒体控制区遗传多态性及系统进化分析. 安徽农业大学学报, 43(5): 690 - 693]

Zhang M, Zhao P, Yin J, Li T, Zhang TT, Cao TW, Ma EB, 2017. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Parnassius nomion* (Lepidoptera: Parnassiidae) and analysis of the higher-level phylogenetic relationships of butterflies based on mitochondrial genome. *Acta Entomol. Sin.*, 60(11): 1324 - 1338. [张敏, 赵盼, 尹洁, 李涛, 张婷婷, 曹天文, 马恩波, 2017. 小红珠绢蝶线粒体基因组特征及基于线粒体基因组的蝶类高级阶元系统发育关系分析. 昆虫学报, 60(11): 1324 - 1338]

Zhang ML, Xiang XG, Xue JJ, Sanderson SC, Fritsch PW, 2016. Himalayan uplift shaped biomes in Miocene temperate Asia: evidence from leguminous Caragana. *Sci. Rep.*, 6: 36528.

Zhang YL, Wang BH, Niu L, 2015. The research on Parnassiidae in Qinghai-Tibet plateau. *Tibet Sci. Technol.*, (6): 22 - 25. [张亚玲, 王保海, 牛磊, 2015. 青藏高原绢蝶 Parnassiidae 调查研究. 西藏科技, (6): 22 - 25]

Zhu WQ, Li HF, Song WT, Xu WJ, Chen KW, 2010. Genetic diversity and origins of Chinese native greylag goose breeds based on mtDNA D-loop sequences. *Chin. J. Ecol.*, 29(3): 549 - 553. [朱文奇, 李慧芳, 宋卫涛, 徐文娟, 陈宽维, 2010. 基于线粒体 DNA D-loop 区序列的我国灰鹅遗传多样性和起源分析. 生态学杂志, 29(3): 549 - 553]

（责任编辑：马丽萍）